

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650064

研究課題名(和文)アクチン伸長端調節因子の協同作用による新規細胞骨格ターンオーバー制御機構の解明

研究課題名(英文)The cooperative effect of actin barbed end regulators on controlling the filament turnover mechanisms

研究代表者

武田 修一 (Takeda, Shuichi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50509081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アクチンは、細胞運動の駆動力を産むタンパク質で、細胞内において単量体型と、それらが集まってできるアクチン繊維の二つの状態間をダイナミックに遷移している。アクチンキャッピングタンパク質(CP)は、アクチン繊維の端に強固に結合することで、その離散集合を阻害するため、細胞運動制御の重要な因子として知られている。本研究では、おもにX線結晶解析法という手法を用いて、CPのアクチン繊維への結合能を阻害する様々なタンパクとCPとの相互作用様式を明らかにした。その結果、細胞内にはCPを介してアクチン繊維の量を巧妙にコントロールする仕組みがあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cell motility is driven by a dynamic assembly of a cytoskeletal protein, actin that exists in two states; monomeric form (called G-actin) or filamentous form (actin filaments). The actin capping protein (CP) binds tightly to the end of actin filaments and stops the assembly and disassembly of the filaments, thus playing an important role in controlling the cellular dynamics. In this study, by using X-ray crystallography, we have revealed the modes of interaction between CP and its binding partners. Our results suggest that, by regulating the filament end-binding affinity of CP, cells control the amount of the monomeric form actin to achieve collective migration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アクチン アクチンダイナミクス アクチンキャッピングタンパク質 X線結晶構造解析 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

アクチン繊維の伸長端(B 端)に強く結合するキャッピングタンパク質(CP)は、細胞運動の必須調節因子である。我々はCPのB端キャップ機構を研究してきた。例えば CARMIL は、すでに B 端をキャップしている CP に働きかけてこれを引き剥がす、アロステリックな“アンキャッピング”因子であることを明らかとした(Takeda et al., PLoS Biol, 2010, Takeda et al., Phys Biol, 2011)。

植物を除く真核細胞で高く保存されているツイインフィリン(Twf)は、アクチン脱重合促進因子として知られるコフィリンと相同なドメイン、Twf-N、Twf-C からなる(図 1)。Twf の性質として、1) ADP-アクチンに高い親和性を持つ、2) B 端と結合する、3) C 末端領域(Twf-Ctail)で CP と結合する(CARMIL と異なり CP の活性は阻害しない)、ことが知られているが、どのような形で細胞内アクチン制御に貢献しているかは不明である。

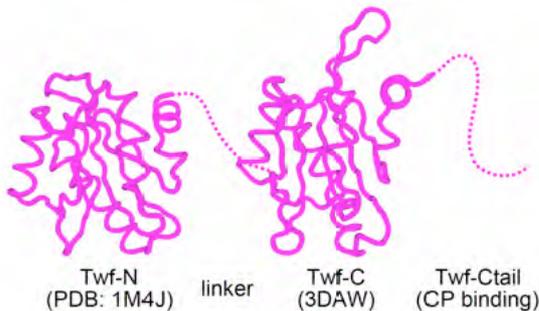


図1: Twfは二つのコフィリン様ドメインとCP結合tailからなる

上述のように Twf は、主要なアクチン制御タンパク質であるコフィリンと相同なドメインを二つ持つことから、その機能もコフィリンから類推されてきた(総説: Poukkula, et al., Cytoskeleton, 2011)。コフィリンは、ADP-アクチン繊維側面に協同的に結合し、その構造を変えることによってアクチン繊維の脱重合や切断を促進する。しかし Twf はアクチン繊維側面には結合できないため、単量体 ADP-アクチンの捕捉による間接的な重合阻害活性しか持たないとされている。また B 端キャッピング活性についても、Twf よりも 100 倍以上強く B 端と結合する CP と共存する系においてその重要性は疑問である。

2. 研究の目的

Twf がそれ自身でも B 端に結合できるのに、さらに B 端に局在する CP との結合領域(Twf-Ctail)を持つ事は興味深い。このことは、これまであまり注目されていなかった Twf と CP との結合が、その機能に重要である可能性を示唆する。そのため本研究では、構造生物学的手法と生化学実験を組み合わせることで、CP と Twf-Ctail の相互作用様式を解析し、アクチン繊維 B 端制御機構における Twf の役割の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) タンパク質試料の調整

アクチンはニワトリ骨格筋より調製したアセトンパウダーから、定法で精製した。CP (ニワトリ alpha1/beta1) は大腸菌 BL21(DE3)を宿主として発現したのち、硫酸沈殿、ハイドロキシアパタイトカラム、陰イオン交換カラムを用いて精製した。結晶化に用いた Twf-Ctail 合成ペプチドは、MBL より購入した。また生化学実験に使用した、N 末端に GST タグを融合した各種 Twf コンストラクト、及び CARMIL は、大腸菌 BL21(DE3)を宿主として発現したのち、グルタチオンビーズを利用してアフィニティ精製した。

(2) CP/Twf-Ctail 複合体の結晶構造解析

CP と Twf-Ctail をモル比 1:1.5 で混合し、4°C, 1h インキュベートした後、ゲル濾過カラム (Superdex200, 16/60; GE ヘルスケア) で複合体を精製した。タンパク質濃度 10mg/ml となるように濃縮後、蒸気拡散法での結晶化を試みた。リザーバー溶液条件等の最適化により、複合体単結晶を得た。X 線回折装置 (FR-E/R-AXIS IV; リガク) を用いて、反射データを収集した。構造解析には ccp4i program suite 中の各種プログラムを用いた。既知の CP 構造を探索モデルとして、分子置換法によって、初期位相を求めた。Refmac5 と coot を用いた構造精密化によって、構造を決定した。

(3) タンパク質相互作用アッセイ

各種タンパク質の相互作用には、以下の方法を用いた。表面プラズモン共鳴法による測定には、Biacore2000 (GE ヘルスケア) を利用した。N 末端に GST タグを結合した Twf、または CARMIL を化学架橋法でセンサーチップに固定後、CP を灌流することで結合アフィニティを求めた。プルダウンアッセイにて、GST 融合タンパク質とリガンドとの結合能を調べた。また、分析用ゲル濾過カラム (Superdex 200 10/30; GE ヘルスケア) を用いて、複数のタンパク質の複合体形成能を調べた。

4. 研究成果

(1) CP/Twf-Ctail 複合体の結晶構造

まず CP と Twf-Ctail の結合様式を原子レベルで理解するために、両者の複合体の結晶構造解析を試みた。Twf-Ctail は単独では特定の立体構造を取らない天然変性領域であるため、CP との結合に関与しない複合体からはみ出した部分が、結晶パッキングの妨げとなる可能性がある。このため、表面プラズモン共鳴法によって Twf の CP 結合最小領域を探索したところ、Twf Lys315-Glu344 の 30 残基で十分であることがわかった。この領域に相当する全長 30 残基の合成ペプチドは、CP と安定な複合体を形成したため、この CP/Twf-Ctail 複合体の結晶化を試みた。条件探索の結果、最高分解能 2.0Å の反射を与える単結晶が得られた (図 2)。



図2 ; CP/Twf-Ctail複合体の結晶

構造解析の結果、図 3 に示す CP/Twf-Ctail 複合体構造が明らかとなった。驚くべきことに、Twf-Ctail は、CP 阻害因子である CARMIL と結合部位を共有することが明らかとなった。このことは、Twf が CARMIL の CP 阻害能を制御する因子である可能性を示唆する。そこで、溶液中における両者共在時の CP 結合能を、GST プルダウンアッセイ、分析ゲル濾過カラム、及び表面プラズモン共鳴法によって調べた。いずれの方法を用いた場合でも、Twf と CARMIL は CP への結合を競合する事が示された。

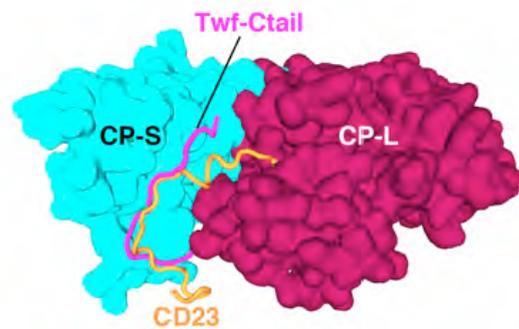


図3 ; CP/Twf-Ctail複合体の結晶構造。CP (surface表示) 上の Twf-Ctail (tube表示 : ピンク) 結合部位は、CARMIL タンパク質の一種 CD23 (オレンジ) と重なる

(2) 新たな B 端制御モデル

図 4 は CP/Twf-Ctail 複合体構造を、以前に申請者が報告したアクチン繊維/CP 複合体の電子顕微鏡構造 (Narita, Takeda, et al., EMBO J, 2006)、他のグループによる Twf-C/単量体アクチン (Paavilainen, et al., J Cell Biol, 2008)、コフィリン/アクチン繊維複合体 (Galkin, et al., PNAS, 2011) の原子構造に重ね合わせたものである。二つの B 端アクチンサブユニットと結合する Twf-N、Twf-C ドメインと、CP の CARMIL 結合サイトを覆う Twf-Ctail が理想的な位置関係になることがわかる。さらに Twf が ADP-アクチンに対して親和性が高いことを考慮すると、Twf のアクチン制御機構に関して次のような仮説が考えられる (図 5)。

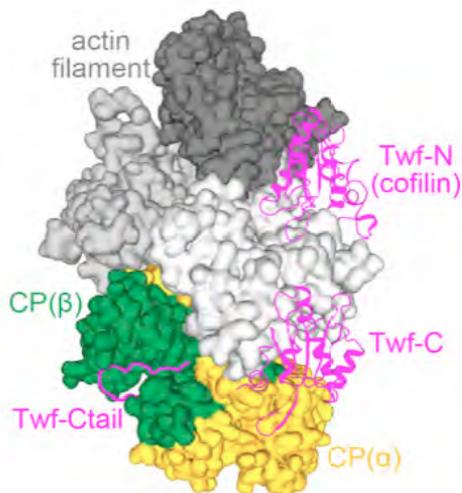


図4；B端におけるCPとTwfの同時結合モデル

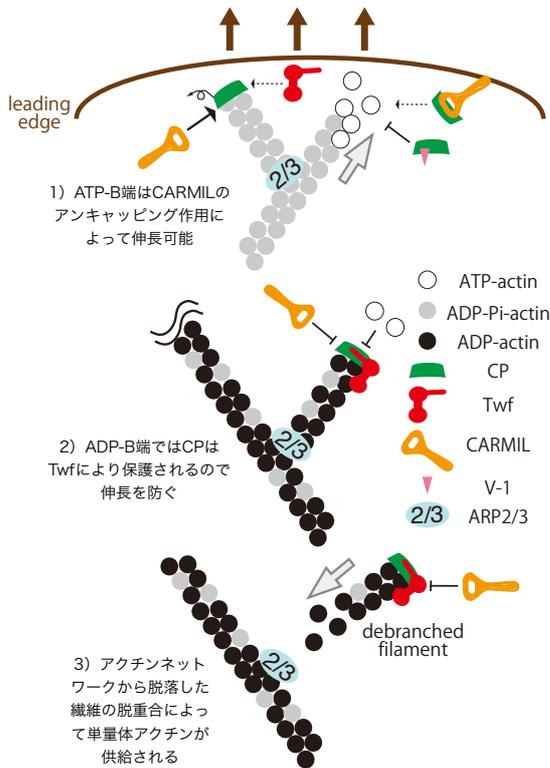


図5；B端調節因子によるアクチンターオーバー制御仮説

- 1) 細胞膜近傍において Arp2/3 複合体などの核形成因子によってできる新生アクチン繊維 B 端の結合ヌクレオチドは ATP、もしくは ADP-Pi である。ここが CP にキャップされても、CARMIL のようなアンキャッピング因子の働きにより、伸長可能な B 端が保たれ、細胞運動を駆動する。
- 2) 時間が経ち、細胞先端から離れて位置するア

クチン繊維は ADP-アクチンが大半を占める。この繊維 B 端をキャップする CP は Twf によって CARMIL から保護されるため、膜伸展に寄与しない無駄な重合を防ぐことができる。

3) この“静的”な繊維は、やがて Arp2/3 複合体からの解離やコフィリンなどの働きによって他端から脱重合し、重合可能な単量体アクチンの供給源となる (CP はこの繊維の B 端重合も防ぐ)。

現在広く受け入れられているアクチンダイナミクスモデルでは CP による B 端キャッピングはランダムに起こる反応であると想定されている。本仮説は、アクチンのヌクレオチド状態を目印として、細胞膜伸展に必要なアクチン繊維と、不用となってリサイクルされるべき繊維を巧妙に分別する新しい仕組みを提唱するものであり、細胞運動研究に大きく貢献する事が予測される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Koike, R., Takeda, S., Maéda, Y., Ota, M. Comprehensive analysis of motions in molecular dynamics trajectories of the actin capping protein and its inhibitor complexes, *Proteins*, 査読有, Vol.84, issue 7, 2016, pp. 948-956

(2) Kato, N., Ishijima, A., Inaba, T., Nomura, F., Takeda, S., Takiguchi, K. Effect of lipid composition and solution condition on the mechanical property of membrane vesicle, *Membranes*, 査読有, Vol.5, issue 1, 2015, pp. 22-27

[学会発表] (計 7 件)

(1) Takeda, S., Maéda, Y. Crystal structure of FA2 demonstrates filamentous actin structure Alpbach meeting; Myosin, muscle and many

motors, 2016.3.12-18, Alpbach, (Austria)

(2) 小池 亮太郎、武田 修一、前田 雄一郎、
太田 元規

動的構造に着目した CARMIL 蛋白質によるキャ
ップ蛋白質の機能阻害メカニズムの解明

第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015.6.24-26,
あわぎんホール, 徳島県

(3) Takeda, S., Koike, R., Ota, M., Maéda, Y.,
How the binding of CP (capping protein) to the
B-end of actin filament is regulated

European Muscle Conference, 2014.9.10-14
(2014) ポスター発表

(4) Takeda, S., Koike, R., Ota, M., Maéda, Y.
How the binding of CP (capping protein) to the
B-end of actin filament is regulated

Gordon Resaerch Conference, Muscle and Motor
Proteins, 2014.7.6-11, Mount Snow (USA)

(5) Ota, M., Takeda, S., Maéda, Y., Koike, R.,
How an intrinsically disordered region functions:
a case of CARMIL protein

The 4th APPA (Asia Pacific Protein Association)
Conference, 2014.5.17-20, Jeju (Korea)

(6) 太田 元規、武田 修一、前田 雄一郎、小
池 亮太郎

Dynamical study of capping protein by Motion
Tree

第 51 回日本生物物理学会年会, 2014.9.25-27,
京都大学(京都府)

(7) 小池 亮太郎、武田 修一、前田 雄一郎、
太田 元規

CARMIL 蛋白質の天然変性領域によるアロステ
リックなキャップ蛋白質の機能制御

第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12-14,
とりぎん文化会館 (鳥取県)

[その他]

ホームページ

<http://str.bio.nagoya-u.ac.jp:8080/Plone/524d753030eb30fc>

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 修一(TAKEDA Shuichi)

名古屋大学・大学院理学研究科・研究員

研究者番号:50509081

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

成田 哲博(NARITA Akihiro)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号:30360613